



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102898478 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201210282037. 9

(22) 申请日 2012. 08. 09

(71) 申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路
135 号

(72) 发明人 毛宗万 郑小辉 钟毅芳 黄华珍
计亮年

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 陈卫

(51) Int. Cl.

C07F 15/00 (2006. 01)

A61K 31/555 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

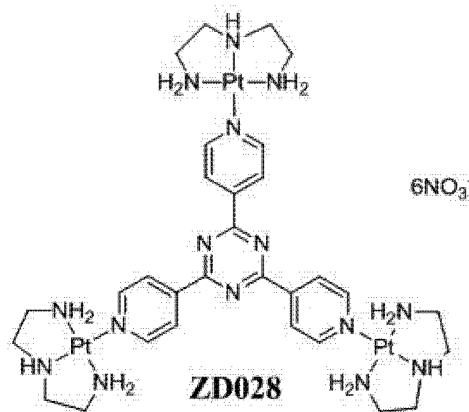
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

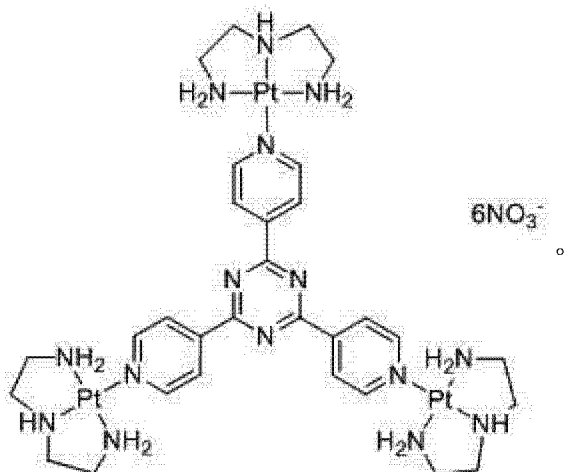
一种高效端粒酶抑制剂及其在抗肿瘤药物中的
应用

(57) 摘要

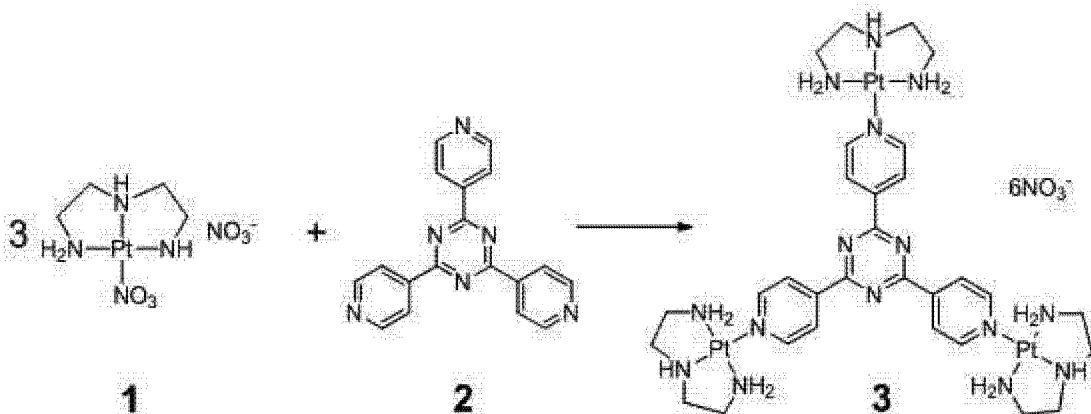
本发明公开了一种涉及能高效抑制端粒酶活性的三核铂配合物 (ZD028), 及其制备方法和作为抗肿瘤药物方面的应用。本发明配合物能特异性的抑制癌细胞的端粒酶活性, 破坏癌细胞赖以永生的端粒维持机制, 加速癌细胞的端粒缩短, 诱导癌细胞的衰老, 导致癌细胞的死亡, 达到治疗恶性肿瘤的目的, 且对正常细胞的毒性非常的低。常规抗肿瘤药物包括但不限于阿霉素、顺铂、紫杉醇。与常规抗肿瘤药物相比, 配合物 (ZD028) 由于对正常细胞的低毒性, 降低了其对其他器官或系统的毒副作用。此外, 由于该制备方法简单易行、成本较低、在一般化学实验室均可完成、且生产过程对环境无污染, 因此该三核铂配合物 (ZD028) 可用作一种新型的潜在的抗肿瘤药物。



1. 一种三核铂配合物,其特征在于结构式如下:



2. 根据权利要求 1 所述的三核铂配合物的制备方法,其特征在于反应式如下:



反应式中,(1)是氯离子被硝酸根取代的单齿铂配体的结构式,(2)是桥联配体的结构式,(3)是最终产物三核铂配合物的结构式。

3. 根据权利要求 2 所述的该三核铂配合物的制备方法,其特征在于反应步骤如下:

单齿铂配体脱氯:将所述的单齿铂配体溶于水中,再加入硝酸银,在惰性气体保护下避光反应,离心后保留清液;

三核铂配合物合成:往上述脱氯后的清液中加入所述的桥联配体,在惰性气体保护下避光反应,反应完毕后,加入无水乙醇洗涤,离心得到固体物质,即目标三核铂配合物。

4. 根据权利要求 3 所述的三核铂配合物的合成方法,其特征在于所述的惰性气体为氮气。

5. 根据权利要求 3 所述的三核铂配合物的合成方法,其特征在于所述的单齿铂配体脱氯步骤的避光反应条件为:45 度反应 36 小时。

6. 根据权利要求 3 所述的三核铂配合物的合成方法,其特征在于所述的三核铂配合物合成步骤的避光反应条件为:95 度避光反应 3 天。

7. 根据权利要求 3 所述的三核铂配合物的合成方法,其特征在于反应步骤如下:

单齿铂配体脱氯:将所述单齿铂配体溶于适量的水中再加入 3 倍摩尔量的硝酸银,在氮气保护下避光反应 36 小时,用低温离心机离心,弃去沉淀,保留清液;

三核铂配合物合成:往上述脱氯后的清液中加入摩尔比为 0.3:1 的所述的桥联配体,

氮气的保护下,于95度避光反应3天,反应完毕后,加入无水乙醇,离心得到固体物质,即目标三核铂配合物。

8. 根据权利要求1所述的三核铂配合物在作为端粒酶抑制剂方面的应用。

9. 根据权利要求1所述的三核铂配合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

10. 根据权利要求1所述的三核铂配合物作为高效的端粒酶抑制剂在抗肿瘤治疗联合用药方面的应用。

一种高效端粒酶抑制剂及其在抗肿瘤药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种能高效抑制端粒酶活性的三核铂配合物 (ZD028), 及其制备方法和作为抗肿瘤药物方面的应用。具体涉及能高效抑制端粒酶活性的三核铂配合物 (ZD028) 的制备方法及其可作为抗肿瘤药物的应用。

背景技术

[0002] 目前, 恶性肿瘤是危害人类健康和生命的重大疾病, 但抗肿瘤新药研发是不断更新, 有中药, 也有西药。长期大量的临床证明, 抗肿瘤药物均存在毒副作用较大的通病。外科手术适用于某些局部性肿瘤早期和中期的治疗, 但多数病人靠手术治疗是不能防止肿瘤的复发和远处转移的。放、化疗虽然有相当高的治愈率, 但是常引起如骨髓抑制、免疫低下等毒副反应, 使患者难以坚持治疗。化疗药物在治疗过程中出现的耐药性, 已成为目前临床治疗中的难题之一。正是由于这些原因, 我们正要寻找抗肿瘤新药。

[0003] 以核酸为靶点的抗癌药物应该是最具发展前景的抗癌药物, 因为此类药物可以从根本上抑制癌细胞的产生、发展和增值。G- 四链体 DNA 作为有重要生物功能的特殊二级结构, 以其为靶点的抗癌药物的设计具有合理性与优越性, 主要由于此结构有以下特征: 1), 结构的特殊性: 区别于普遍存在的双链 DNA, 特殊的结构才能为有选择性的小分子化合物提供设计平台; 2), 作用的特殊性: 有特殊的生物学功能, 小分子化合物通过稳定、拆散或改变它的这种二级结构, 可以达到特异性抑制癌细胞的目的; 3), 存在于体内重要基因区域。随着分子生物学和结构生物学的发展, G- 四链体的结构多样性和生物功能性得到不断阐明。因此, 以各种类型的 G- 四链体为作用靶点的药物研究引起了人们广泛的兴趣和重视。配合物诱导形成 G- 四链体结构并有效稳定该结构, 进而抑制端粒酶的活性, 破坏癌细胞的端粒维持机制, 加速癌细胞的衰老, 进而导致癌细胞的死亡, 同时由于端粒酶在正常细胞中是没有活性的, 只有在癌细胞中才具有高的活性, 因此这有助于找到显著的选择性对癌细胞增殖具有强的抑制作用的抗癌药物。

[0004] 由于金属配合物具有很多有机小分子难以比拟的优点, 如丰富多样的配位结构及电子性能, 更重要的是它们往往具有一些有趣的特性, 例如光学、磁学、催化功能等等, 这些为设计成为优秀的 G- 四链体稳定剂带来很大的潜力与可能性。目前报道的稳定 G- 四链体的金属配合物中金属离子的种类已越来越多, 到现在为止以贵金属铂为中心构建的配合物来稳定 G- 四链体还不是很多。铂类配合物作为抗肿瘤药物的研究开始于二十世纪六十年代, 目前使用于临床药物的几种铂配合物 (顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂以及乐铂等等) 都是以靶向双链结构的核酸为主。尽管以 G- 四链体为靶的选择性抗癌药物的研究也只有 10 多年, 但已陆续开始有新的小分子化合物进入临床实验, 不过这些化合物中还没有金属配合物。

[0005] 考虑到 G- 四链体的芳香平面结构特点, 比较而言由铂离子配位构建的金属铂 (II) 配合物具有其独特的优越性。例如本专利所涉及的三核铂配合物 (ZD028)。

[0006] 桥联配体是一系列含氮的杂环, 使配合物更容易和 G- 四链体发生 $\pi-\pi$ 堆积作

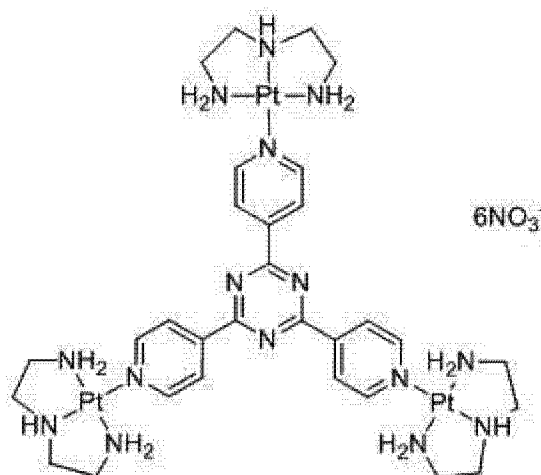
用,进而能高效的稳定此结构,进而提高端粒酶活性的抑制能力。

[0007] 本发明通过超分子自组装机杂化三核铂配合物,简化其合成,降低生产成本,并通过引入特定的有机功能基团使其具有高的 G- 四链体靶向性、高的端粒酶活性抑制能力以及抗癌活性。

发明内容

[0008] 本发明目的是设计出一种涉及能高效抑制端粒酶活性的三核铂配合物 (ZD028), 及其制备方法和作为抗肿瘤药物方面的应用。

[0009] 本发明提供的抗癌药物,是利用超分子自组装而成的有机杂化三核铂配合物,结构式如下:

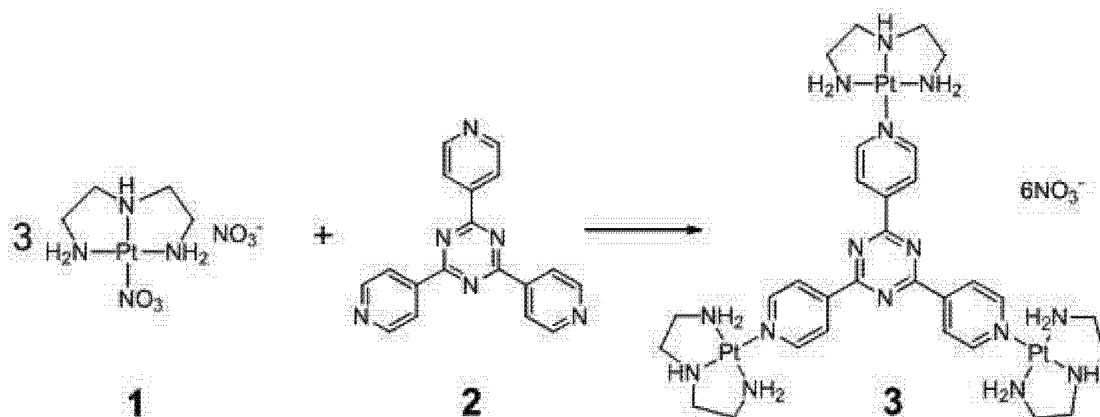


ZD028

本发明具有优异端粒酶活性抑制能力的三核铂配合物的合成方法,利用超分子自组装和 Pt(II) 的平面正方形的配位构型以及中间桥联配体独特的几何构型而制得的。进一步说,是利用超分子自组装将辅基配体与桥联配体组装成三核结构,得到具有高的 G- 四链体靶向性、高的端粒酶活性抑制能力以及抗癌活性的三核铂配合物。

[0010] 本发明所述的能高效抑制端粒酶活性的三核铂配合物(在本专利中命名为 ZD028),更进一步说,其合成是将氯离子被硝酸根取代的侧臂单齿铂配体 [Pt(dien)(NO₃)] (NO₃) 与相应的桥联配体通过自组装而成,使得该配合物具有高的端粒酶抑制能力以及抗癌活性。

[0011] 该三核铂配合物 (ZD028) 的合成方法,反应式如下:



反应式中, (1) 是氯离子被硝酸根取代的侧臂单齿铂配体桥联配体 $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)$ 的结构式, (2) 是桥联配体的结构式, (3) 是最终产物三核铂配合物 (ZD028) 的结构式。

[0012] 具体来说, 本发明提供的具有高的 G- 四链体靶向性、高的端粒酶抑制能力以及抗癌活性的三核铂配合物 (ZD028) 的合成方法, 包括如下步骤:

单齿铂配体脱氯: 将所述的单齿铂配体溶于水中, 再加入硝酸银, 在惰性气体保护下避光反应, 离心后保留清液。

[0013] 三核铂配合物合成: 往上述脱氯后的清液中加入所述的桥联配体, 在惰性气体保护下避光反应, 反应完毕后, 加入无水乙醇洗涤, 离心得到固体物质, 即目标三核铂配合物。

[0014] 上述的惰性气体保护及避光均为反应的关键步骤。其中惰性气体保护的作用, 是在于隔绝空气或其他具有氧化性的气体。应当理解为, 任何一种可以实现上述目的的手段, 都可以作为替换手段用于本发明, 并且这种替换并不脱离本发明的保护范围。

[0015] 作为优选的方案, 所述的惰性气体为氮气; 单齿铂配体脱氯步骤的避光反应条件为: 45 度反应 36 小时; 所述的三核铂配合物合成步骤的避光反应条件为: 95 度避光反应 3 天。

[0016] 可以采用以下步骤来合成所述三核铂配合物 (ZD028)。

[0017] 单齿铂配体 $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot \text{HCl}$ 脱氯: 将单齿铂配体溶于适量的水中再加入其 3 倍摩尔量的硝酸银, 于 45 度在氮气保护下避光反应 36 小时, 用低温离心机离心, 弃去沉淀, 保留清液。

[0018] 三核铂配合物 (ZD028): 往上述脱氯后的清液中加入摩尔比为 0.3:1 的桥联配体。整个反应在氮气的保护下, 于 90 度避光反应 3 天, 反应完毕后, 加入适量的无水乙醇, 再用该溶剂洗涤 3 次, 离心得到固体物质, 即三核铂配合物 (ZD028)。

[0019] 本发明所述的单齿铂配体为氯离子被硝酸根离子取代的。

[0020] 本发明发现, 所述的三核铂配合物在抑制端粒酶方面具有突出的效果, 可以作为端粒酶抑制剂。进一步地说, 本发明的三核铂配合物可以被用于制备抗肿瘤药物。

[0021] 本发明在研究三核铂配合物 (ZD028) 作为端粒酶抑制剂来达到抗肿瘤效果时, 发现该配合物对一系列端粒酶呈高表达的肿瘤细胞 [例如: A549 (人肺癌细胞), HepG2 (人肝癌细胞), HeLa (人宫颈癌细胞), CNE-2 (人鼻咽癌细胞), MCF-7 (人乳腺癌细胞) 等] 均具有优异的端粒酶抑制能力, 但是由于宫颈癌居妇女癌症发病率之首且 HeLa 细胞中端粒酶的活性是非常的高并数量也非常的多, 所以以下我们的实施例主要是以 HeLa 细胞为试验对象。但这并不意味着本发明所述配合物仅能作用于所列举的肿瘤细胞, 本领域技术人员应当能够理解, 所列举的肿瘤细胞不能作为本发明保护范围的限制。

[0022] 本发明具有以下的技术效果:

本发明以简单易合的单齿铂配体为辅基配体与相应的桥联配体, 通过超分子自组装的方法合成和表征了一种具有高的 G- 四链体靶向性、高的端粒酶抑制能力以及抗癌活性的三核铂配合物 (ZD028)。通过荧光能量共振转移 (FRET) 实验、端粒酶抑制 (TRAP) 实验、长期细胞增殖实验和 β -半乳糖苷酶染色实验证明了该化合物具有优异的端粒酶活性抑制能力以及抗癌活性。

附图说明

[0023] 图 1 为三核铂配合物 (ZD028) 的结构示意图；

图 2 显示了三核铂配合物 (ZD028) 对端粒酶活性的抑制能力；

图 3 显示了三核铂配合物 (ZD028) 对 HeLa 细胞长期增殖的影响

图 4 为 HeLa 细胞中衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色实验,三核铂配合物 (ZD028) 浓度为 15 μ M, A 为对照组, B 为加药组。

具体实施方式

[0024] 以下结合实施例对本发明进行详细的描述。

[0025] 实施例一

有机杂化三核铂配合物的合成 (ZD028):将 0.5 毫摩尔量的单齿铂配体 [Pt(dien)Cl]Cl·HCl 溶于 6 毫升水中,在氮气保护下于暗处加入 1.5 毫摩尔量的硝酸银,45 度搅拌 36 小时,反应完毕后,离心弃去沉淀,保留清液;往上述的清液中加入 0.15 毫摩尔的桥联配体,整个反应在氮气保护下于 90 度避光反应 3 天,反应结束后,往反应液中加入适量的无水乙醇,析出浅黄色固体,离心得浅黄色固体,产物真空干燥。产率:83%。元素分析(%),

理论值: $C_{30}H_{51}N_{21}O_{18}Pt_3 \cdot 6H_2O$: C, 21.36; H, 3.76; N, 17.43. 实验值: C, 21.20; H, 3.76; N, 17.52. ^{195}Pt NMR (D_2O , δ /ppm): -1222.20, and K_2PtCl_4 被用作内标物 ($\delta=0$).

该化合物的结构式如图 1 所示。

[0026] 实施例二

荧光能量共振转移 (FRET) 实验:将 10 μ M 人类端粒 DNA (F21T)、启动子 DNA (c-kit) 或双链 DNA (dsDNA) 与 10 μ L 不同浓度的配合物 (ZD028) 溶液混合。将所得的 20 μ L 样品溶液加入 LightCycler 毛细管中并插入 Roche LightCycler 2 型荧光定量 PCR 仪。固定激发波长为 470nm,监测 530nm 的发射荧光强度。温度变化范围为 37 -99 $^{\circ}C$, 升温间隔为 1 $^{\circ}C$,平衡 30 s 后采样, T_m 值计算用 Origin 拟合。数据结果见表 1。实验结果表明该三核铂化合物能特异性的高效的稳定人体端粒 G-四链体 DNA。

[0027] 表 1 三核铂配合物 (ZD028) 对不同 DNA 热稳定能力 (ΔT_m)。

配合物	F21T	c-kit	dsDNA
	$\Delta T_m (^{\circ}C)$		
ZD028	35.4	18.4	3.4

[0028] 实施例三

端粒酶抑制 (TRAP) 实验:收集 HeLa 细胞的裂解液,加入到含有相应浓度配合物的 TRAP 反应液中,进行 PCR 扩增,用 0.8% 的聚丙烯酰胺凝胶分析其扩增产物。数据结果见图 2。实验结果表明,该配合物是一个优异的端粒酶抑制剂 (^{125}I IC₅₀=30 nM)。

[0029] 实施例四

长期细胞增殖实验:将 HeLa 细胞接种于 T25 组织培养瓶中,每四天加入含有相应浓度配合物的培养基或含 0.1%DMSO 的培养基。数据结果见图 3。细胞长期增殖实验表明,该配合物能够降低细胞的生存率,进而达到抗肿瘤的效果。

[0030] 实施例五

β -半乳糖苷酶染色实验:对培养终止后的细胞进行固定、染色,置于40 \times 显微镜下观察、照相。数据结果见图4。因为 β -半乳糖苷酶是细胞衰老的一个重要特征,通过图4可知,该配合物能有效的加速细胞的衰老,进而达到抗肿瘤的效果。

[0031] 以上综合的生测实验结果表明,三核铂配合物(ZD028)通过作用于端粒G-四链体DNA抑制了端粒酶的活性,干扰了癌细胞端粒的维持机制,从而加速了癌细胞端粒长度的缩短,并进而加速了细胞的衰老,最终导致了癌细胞的死亡,并对正常细胞的毒性非常低,因此该三核铂配合物(ZD028)可作为一种潜在的抗肿瘤药物。

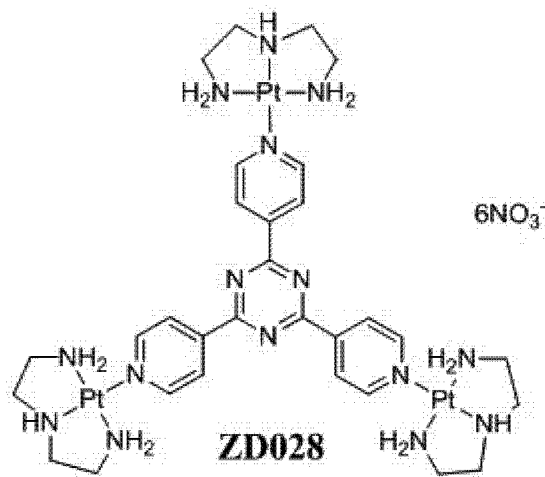


图 1

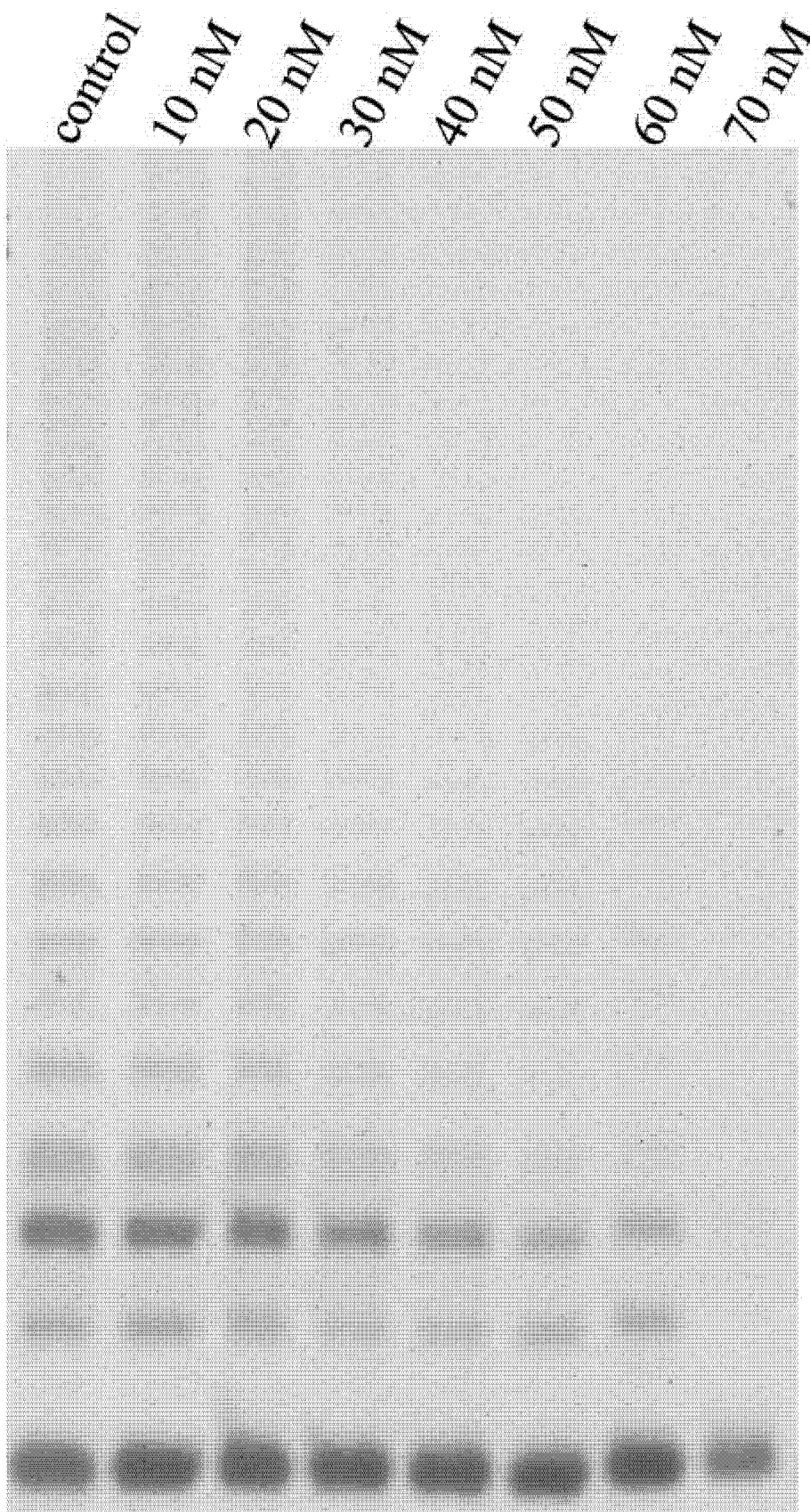


图 2

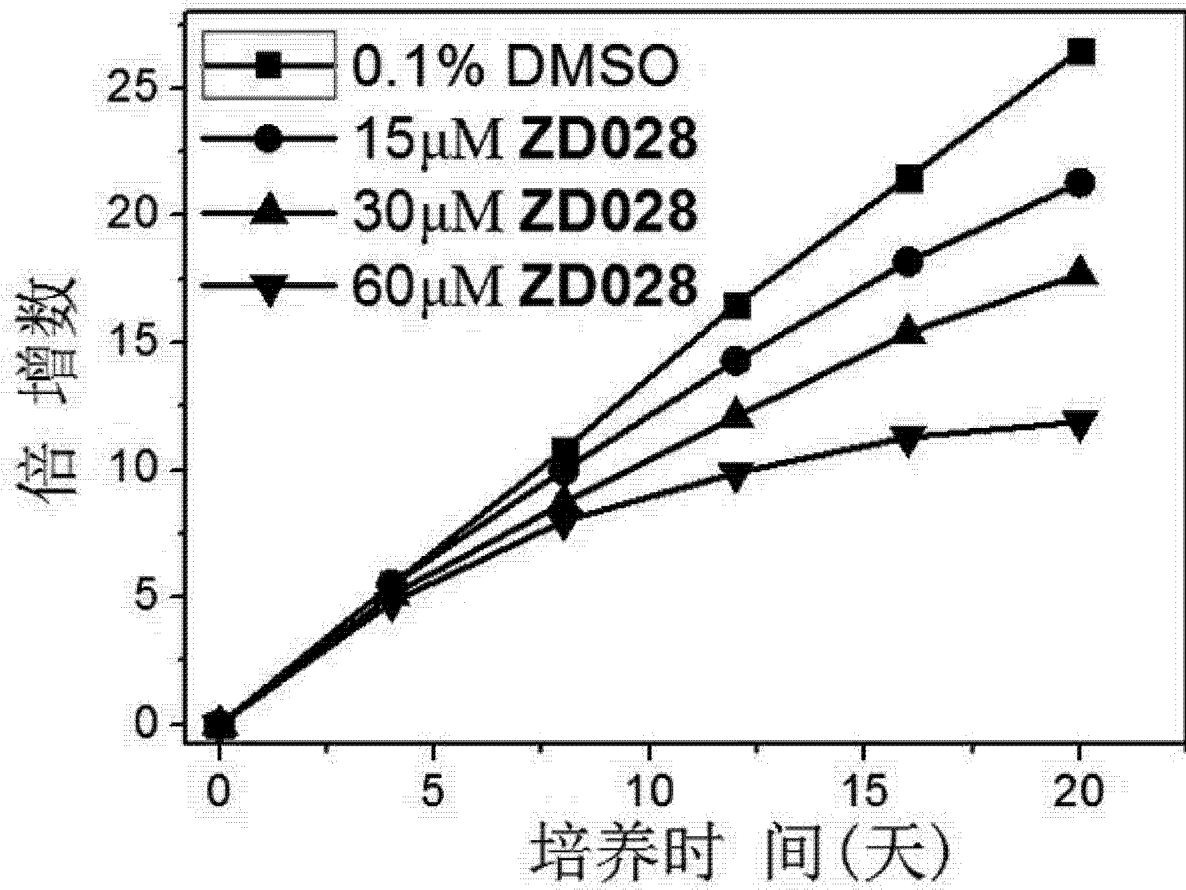


图 3

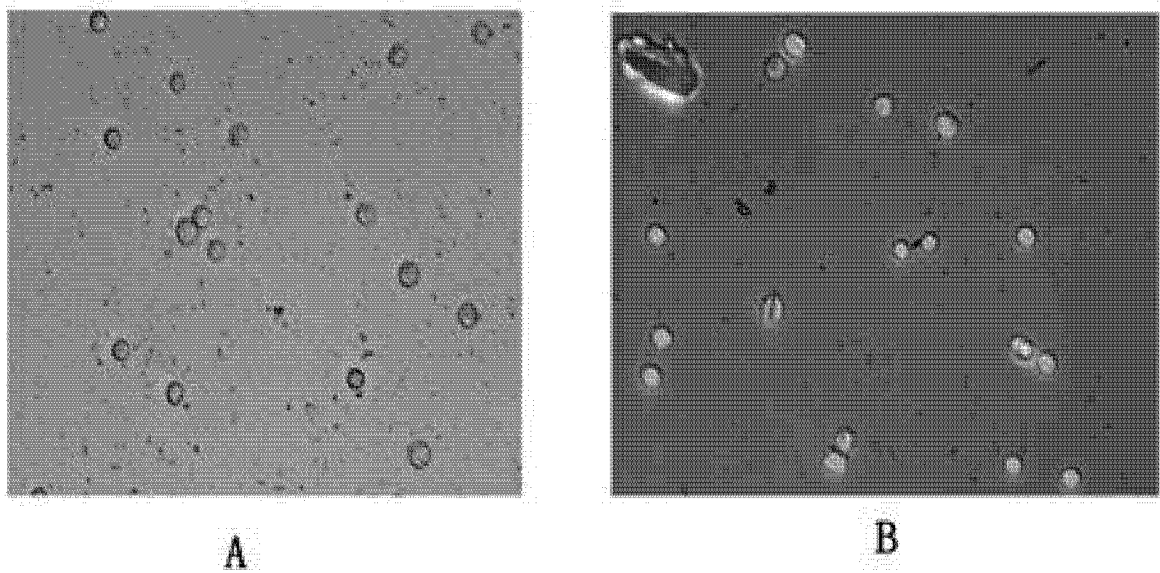


图 4